

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 57-040409

(43)Date of publication of application : 06.03.1982

(51)Int.Cl.

A61K 31/195

A61K 31/10

A61K 31/13

A61K 31/15

(21)Application number : 55-114756

(71)Applicant :

mitsui toatsu chem inc

(22)Date of filing : 22.08.1980

(72)Inventor :

hayakawa taro

soda kenji

awayak akira

okada nobuyuki

kawamo hirosaki

nishina takashi

yokoyama tatsuro

ota kimi

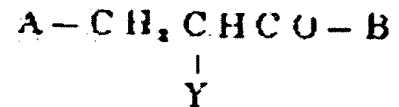
asahina toshiro

(54) REMEDY FOR DISEASE CAUSED BY EXTRAORDINARY PROPAGATION OF COLLAGEN

(57)Abstract:

PURPOSE: A remedy for diseases caused by extraordinary propagation of collagen, having low toxicity, comprising an amino acid derivative, e.g., γ -glutamylhydrazine, its physiologically acceptable ester or salt as an active ingredient.

CONSTITUTION: The titled remedy comprising an amino acid derivative shown by the formula [A is $\text{NH}_2\text{NHCOCH}_2-$, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2$, $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{S}(=\text{O})-$; Y is H, NH_2 , NH_2 ; B is OH or NHOH] or its physiologically acceptable ester or salt as an active ingredient, having small side effects, controlling specifically LO enzyme activity participating in the crosslinking formation of collagen fibers. For example, N-[3-(2-aminoethylthio)-alanyl]-hydroxylamine, N-(ornithyl)-hydroxylamine, 3-(aminomethylsulfinyl)-alanine, 3-(2-aminoethyl)-propionic acid, etc. may be cited as the amino acid derivative.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭57-40409

⑬ Int. Cl.³

A 61 K 31/195
31/10
31/13
31/15

識別記号

A B A
A B A
A B A
A B A

庁内整理番号

6408-4 C
6408-4 C
6408-4 C
6408-4 C

⑭ 公開 昭和57年(1982) 3月 6日

発明の数 1
審査請求 未請求

(全 7 頁)

⑮ コラーゲンの異常増殖を伴う疾病の治療用剤

⑯ 特 願 昭55-114756

⑰ 出 願 昭55(1980) 8月22日

⑱ 発 明 者 早川太郎
名古屋市天白区平針大堤下1335
番地

⑲ 発 明 者 左右田健次
宇治市木幡御蔵山45-61

⑳ 発 明 者 栗屋昭
横浜市戸塚区矢部町1541番地

㉑ 発 明 者 岡田信行
茂原市緑町27番地 1

㉒ 発 明 者 川面博
茂原市東郷2141番地

㉓ 発 明 者 仁科孝士
茂原市東郷2141番地

㉔ 発 明 者 横山辰郎
横浜市磯子区汐見台1407番地

㉕ 発 明 者 大田公威
茂原市東郷1698番地 1

㉖ 出 願 人 三井東圧化学株式会社
東京都千代田区霞が関3丁目2
番5号

㉗ 代 理 人 弁理士 南孝夫

最終頁に続く

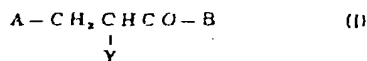
明 細 書

1. 発明の名称

コラーゲンの異常増殖を伴う疾病の治療用剤

2. 特許請求の範囲

1) 一般式



(式中 A は $\text{NH}_2\text{NHCOCH}_2-$ 、 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$ 、

$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ または $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{S}-$ を表わし、

Y は $-\text{H}$ または $-\text{NH}_2$ を表わし、B は $-\text{OH}$
又は $-\text{NHOH}$ を表わす)

で表わされるアミノ酸誘導体又はその生化学
に許容されるエステル又は塩を有効成分とす
るコラーゲンの異常増殖を伴う疾病の治療用
剤。

2) 前記のアミノ酸誘導体が γ -グルタミルヒ
ドラジンである特許請求の範囲第1項記載の
治療用剤。

3) 前記のアミノ酸誘導体が N-[3-(2-

アミノエチルチオ)-アラニル]-ヒドロキ
シルアミンである特許請求の範囲第1項記載
の治療用剤。

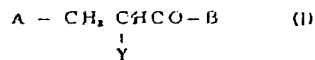
4) 前記のアミノ酸誘導体が N-(オルニチル)-
ヒドロキシルアミンである特許請求の範囲
第1項記載の治療用剤。

5) 前記のアミノ酸誘導体が 3-(アミノメチ
ルスルフィニル)-アラニンである特許請求
の範囲第1項記載の治療用剤。

6) 前記のアミノ酸誘導体が 3-(2-アミノ
エチルチオ)-プロピオン酸である特許請求
の範囲第1項記載の治療用剤。

3. 発明の詳細な説明

本発明は、コラーゲンの異常増殖を伴う疾病の
治療用剤に関する。さらに詳しく言えば、本発明
は、一般式、



(式中 A は $\text{NH}_2\text{NHCOCH}_2-$ 、 $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{S}-$ 、

特開昭57-40409(2)

$$\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{または}-\text{NH}_2\text{CH}_2\overset{\text{O}}{\underset{\text{H}}{\text{S}}}-$$
 を表わし、Yは-Hまたは-NH₂を表わし、Bは-OH又は-NHOHを表わす。

て表わされるアミノ酸誘導体又はその生理学に許容されるエステル又は塩を有効成分とするコラーゲンの異常増殖を伴う疾病の治療剤に関する。

コラーゲン繊維の異常増殖を伴う疾病にはアテローム硬化症、肝硬化症、肥厚性腎症、クロイド、強皮症、リウマチ性関節炎、肺線維症、疥癬症ならびにその他の膠原病が挙げられる(たとえば竹内正の総説蛋白質、核酸酵素20巻、2号、116頁-125頁、1975年参照)。このような疾病に伴う組織の線維化については結合組織の生化学的研究が進歩するにつれ、結合組織の主成分であるコラーゲン繊維の合成過程にプロリン水酸化酵素(以下pH酵素と略記する)やモノアミン酸化酵素の一種と考えられるリジル酸化酵素(以下LH酵素と略記する)の関与が明らかにされてきている。すなわち、早川らは熱傷後に多発する肥厚性瘢痕

形成とLH酵素活性並びにpH酵素活性との関係について検討を加え、pH酵素活性は受傷後1カ月前後の熱傷肉芽組織で正常組織の25~50倍高く、LH酵素活性は受傷後2~3カ月の組織で急激に出現、上昇し、2~3年間高い値を維持していることを示している(熱傷2巻、282頁、1977年)。また、下郷はラットの異物性皮下肉芽腫およびイスの歯肉窩肉芽に低値ながら有意なLH酵素活性を検出しており(日本口腔外誌23巻、380頁、1974年)、さらに竹原はプレオマイシン肺線維症において、マウスの肺組織中の線維化の亢進に伴い有意なLH酵素の高い活性が測定されたと報告している(日本口腔外誌25巻、8頁、1979年)。上記のようにこれらの酵素活性はコラーゲン繊維の過剰産生と密接な関係にあり、この酵素のはたらきを抑制することは線維化抑制の一つの有力な手段と考えられる。そこで他の組織の安定した状態のコラーゲンに影響を与えず、新しく合成されるコラーゲンの組織沈着を特異的に抑制する物質が見い出せばコラーゲンの異常増殖を伴

う疾病の予防ないしは治療に有用であるという考え方でLH酵素活性を阻害することが知られている。β-アミノプロピオニトリルが強皮症の治療に試みられた経過があるが、この物質は比較的毒性の強いことが判明し、むしろD-ペニシラミンが強皮症の治療やリウマチ性関節炎の治療に有用であると考えられている。(イー・デー・ハリスランセット2巻、996頁、1966年)しかしこのD-ペニシラミンも胃腸障害や白血球減少症等の副作用を生じたり、皮疹、発熱などの過敏症状の現れることがあり問題点も多い。

本発明者らは上記のような情況に鑑み、副作用の少ない、コラーゲンの異常増殖を特異的に抑制する薬剤の開発を目的として鋭意研究を重ねた結果、前記の一般式(I)で表わされるアミノ酸誘導体又は生理学的に許容されるエステル又は塩が、毒性が少なく、かつ、コラーゲン繊維の架橋形成に關与しているLH酵素活性を特異的に抑制することを見出した。

本発明はかかる知見に基づいてなされたもので

ある。

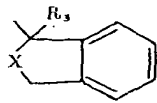
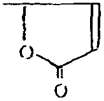
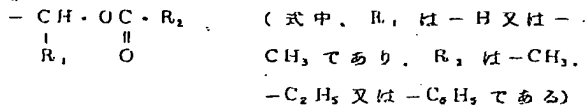
以下に、本発明を詳細に説明する。

まず、前記一般式(I)で表わされるアミノ酸誘導体としては例えばγ-グルタミルヒドラジン、N-(3-(2-アミノエチルチオ)-アラニル)-ヒドロキシルアミン、N-(オルニチル)-ヒドロキシルアミン、3-(アミノメチルスルフィニル)アラニン、3-(2-アミノエチルチオ)-β-プロピオン酸あるいはこれらの化合物の生理学的に許容される無機または有機の塩またはエステルなどを挙げることができる。

一般式(I)において、Bが-OHで表わされるアミノ酸誘導体のカルボン酸部分における塩としてはリチウム、ナトリウム、カリウムなどのようなアルカリ金属の塩、カルシウム、マグネシウムなどのようなアルカリ土類金属の塩、リジン、アルギニン、オルニチン、トリエチルアミン、ベンジルアミン、プロカインなどのような有機塩基との塩を挙げることができる。また、一般式(I)で表わされるアミノ酸誘導体のエステルとしてはC₁~C₄

の低級アルキルエステルの他、生体内で容易に加水分解されるその他のエステルが挙げられる。容易に分解して離脱するエステル基の例としては、

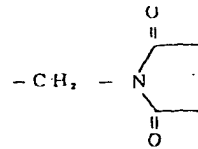
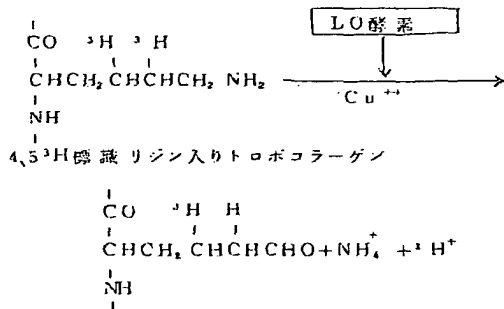
一般式



(式中、XはO又はSであり、R₃は—H、—CH₃、又は—C₆H₅である)

—CH₂OCH₃、又は、

溶性コラーゲン前駆体)中のリジンのε-アミノ基を酸化的脱アミノし、その結果、生じたアルデヒドが縮合して desmosine, isodesmosine (不溶性コラーゲン前駆体) が生成するものであるから、ビネル、マーチン法により、LO酵素活性の測定は、あらかじめ調製した4,5H³ 標識リジン入りトロポコラーゲン(基質)に鶏卵由来のLO酵素を作用させて生成したトリチウム水を減圧蒸留によつて捕集し、ブレイのシンチレーター溶液を混合してその放射活性を測定することによつて行われる。これを式示すると次のようになる。



で表わされるエステル基をあげることができる。

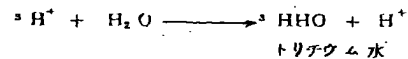
また、一般式(II)中の塩基性基における無機酸または有機酸の付加塩としては塩化水素、臭化水素、アルキルまたはアリルスルホン酸、リン酸、硫酸、酢酸、フマル酸、マレイン酸、酒石酸、クエン酸など塩基性基に対し付加塩を形成する各種の酸との付加塩を挙げることができる。

次に前記一般式(II)で表わされるアミノ酸誘導体に関し、それらの物質の示す各種の薬理学的作用を実験例によつて説明する。

実験例 1 LO酵素活性に対する作用

ビネル及びマーチン(ブローディーニング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス 61 巻、708頁、1968年)の方法に準じて行つた。

すなわち、LO酵素は、トロポコラーゲン(可



上式に示されるようにトリチウム水の生成量はLO酵素活性に依存するから被検液無添加時に生成した放射活性(トリチウム水)を酵素活性100として表わし、各被検液添加時の放射活性を対比した酵素活性に換算して表わすことにより、比較することができる。

標準反応液はアール・シー・シーゲル(ブローディーニング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス 71 巻、4826頁、1974年)の方法に従つて調製した基質溶液 0.25ml、0.4ml の1Mの塩化ナトリウムを含む0.05Mリン酸緩衝液 pH 7.4、1.15ml の酵素液、0.1ml の被検液、0.1ml の純水とトルエン1滴を含むものを用い、対照は純水の代わりに0.1ml の4mg/ml β-アミノプロピオニトリルフマル酸塩溶液を含むものを用いた。37℃で3時間反応させ、0.2ml の50%トリクロ酢酸を加えることにより反応を終了させ、反応中に生成したト

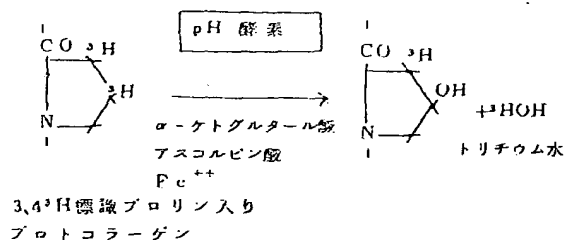
トリチウム水は減圧蒸留によつて拘集し、その1.5mlを10mlのブレイのシンチレーター溶液と混合してその放射活性を測定し酵素活性に換算した。

結果を表1に示す。

表 1

物質名	濃度 (mM)	酵素活性 (%)
	—	100
γ-グルタミルヒドラジン (L)	1.00	4
	0.50	18
	0.05	63
γ-グルタミルヒドラジン (D)	1.00	0
	0.50	23
	0.05	64
N-[3-(2-アミノエチルチオ)-アラニル]-ヒドロキシルアミン	1.00	0
	0.50	20
	0.05	84
N-(オルニチル)-ヒドロキシルアミン	1.00	33
	0.50	63
3-(アミノメチルスルフィニル)アラニン	1.00	69
対照 D-ペニシラミン	1.00	58

すなわち、pH 酵素は、プロトコラーゲン中のプロリンの水酸化反応に関する酵素でコラーゲンの分子間の共有結合を惹起し繊維の安定性に寄与していると考えられているので、バットンらの方法により、pH 酵素活性の測定は、あらかじめ調製した3,4³H 標識プロリン入りプロトコラーゲン(基質)に菌叢由来のpH 酵素を作用させて生成したトリチウム水の放射活性を測定することにより行われる。これを式示すると次のようになる。



放射活性の酵素活性への換算は前述のLH 酵素活性に関する場合と同様である。

その結果を表2に示す。

特開昭57- 40409(4)

実験例 2 pH 酵素活性に対する作用

バットンら(アナリティカル・バイオケミストリー16巻384頁~394頁,1966年)の方法に準じて行つた。

下記の反応混液を直接減圧蒸留用試験管中で30分、30分間振盪し、反応させた後、5%トリクロロ酢酸を0.25ml 添加して反応を停止させ、反応中に生成したトリチウム水を減圧蒸留して集め、2.0ml を採り、それに10ml のブレイのシンチレーション液を加えて放射活性を測定した。

反応混液

1 M トリス - 塩酸緩衝液 pH 7.5	0.25 ml
0.75 mM 硫酸鉄アンモニウム	0.25
12.5 mM アスコルビン酸	0.25
1 mM α-ケトグルタル酸	0.25
基質	0.1
酵素	0.3
被検液	0.1
2.75% トリトン X-100	0.1
純水	1.15

表 2

被検物質名	濃度 (mM)	酵素活性 (%)
なし (水)	—	100
γ-グルタルヒドラジン (L)	1.0	88
γ-グルタルヒドラジン (D)	1.0	89
N-[3-(2-アミノエチルチオ)-アラニル]-ヒドロキシルアミン	1.0	10
	0.5	25
	0.1	78
N-(オルニチル)-ヒドロキシルアミン	1.0	55
3-(アミノメチルスルフィニル)アラニン	1.0	87
3-(2-アミノエチルチオ)-プロピオン酸	1.0	75
対照 D-ペニシラミン	1.0	15

実験例 3 創傷治癒過程に対する作用

動物は8週令のウイスター系雄性ラットを1群5~10匹使用して、シュルテの方法(メジナー・エト・フアルマコロギア・エクスベリメンターリス16, 453, 1967)に準拠して試験した。すなわち、ラット背部の毛を刈り取った後、正中線で対称となるように左右1.5 cmの皮膚切開を加え、切開した部位の中心を1カ所縫合した。次いで化膿防止のため切開部に約3万単位のペニシリンGを塗布し、同時に6万単位のペニシリンGを筋肉内注射した。被検薬は皮膚切開直後より1日1回、5日間皮下注射した。

手術後4日目に抜糸し、6日目にエーテルで殺して皮膚を剥離し、左右の創傷部位を中心にそれぞれたんざく形に切り、両側を一定流量(530ml/min)の水を利用した装置でけん引して、創傷部位が開くまでの重量を測定した。

得られた左右のデータの平均値を求め1匹の結果として対照群(生理食塩液注射群)に対する抑制率を算出した。有意差検定はt-testによった。

表3にその結果を示す。

表 3

被検物質名	用量 (mg/kg) 皮下注射	けん引力 (g)	治癒抑制率 (%)
なし(生理食塩水)	—	218.1±23.5	—
γ-グルタミルヒド ラジン(L)	10 100	172.5±30.4 [*] 100.8±25.2	20.9 53.8
γ-グルタミルヒド ラジン(D)	10 100	251.1±48.2 157.4±15.8	15.1 27.8
N-[3-(2-アミ ノエチルチオ)-アラ ニル]-ヒドロキシルア ミン	10 100	177.1±21.3 116.5±18.6	18.8 46.6
N-(オルニチル)-ヒ ドロキシルアミン	10 100	195.2±26.5 155.1±20.4	10.5 28.9
対照 β-アミノプロピ オニトリル	10 100	148.8±20.0 [*] 112.6±6.1	31.8 48.4

実験例 4 肉芽腫増殖に対する作用

体重170g前後のウイスター系雄性ラットを1群6~8匹使用し、マイエルらの方法(エクスベリエンシア6巻、469頁、1950年)に準拠して試験した。すなわち、ラットをエーテル麻酔下で背部皮下を切開し、肩甲骨上部の両側の皮下を純的に剥離して、あらかじめ秤量減菌した40±1mgの綿球を挿入した。生理食塩液に溶解した被検薬は綿球埋設日から1日1回、6日間皮下注射し、7日目に屠殺して綿球をとりまいて増殖した肉芽腫を他の組織から区別して綿球と共に摘出し、72時間50℃で乾燥後秤量して綿球重量をさし引き肉芽重量として比較した。

結果は表4に示す。

表 4 肉芽腫増殖に対する作用

被検物質名	用量 (mg/kg/day) 皮下注	肉芽重量 (mg)	抑制率 (%)
なし(生理食塩水)	—	58.6±3.3	—
γ-グルタミルヒド ラジン(L)	10 100	47.2±2.0 [*] 35.2±2.4 ^{**}	19.5 39.9
N-[3-(2-アミ ノエチルチオ)-アラ ニル]-ヒドロキシルア ミン	10 100	47.5±4.0 46.9±3.5 [*]	18.9 20.0
N-(オルニチル)- ヒドロキシルアミン	10 100	49.3±2.4 47.1±2.5	15.7 19.5
対照 β-アミノプロ ピオニトリル	10 100	49.4±2.1 [*] 45.2±2.2 [*]	15.7 22.9

* 5%有意

** 1%有意

実験例 5 急性毒性試験

動物は5週令のddy系雄性マウスを1群3匹使用した。被検薬は生理食塩液に溶解し、マウスに0.1 ml/10gあて腹腔内注射した。被検薬注射後、14日間症状観察および死亡例の有無の観察を行い、その死亡率からLD50値を推定した。表5に示したごとく前記のアミノ酸誘導体の毒性はβ-アミノプロピオニトリルのそれに比較して明らかに弱いことが判る。

表 5 急性毒性

被検物質名	推定LD50値 (mg/Kg, 腹腔内注射)
γ-グルタミルヒドラジン(L)	2,000 ~ 3,000
γ- " (D)	2,000 ~ 3,000
N-[3-(2-アミノエチルチオ) アラニル]-ヒドロキシルアミン	2,000 ~ 3,000
N-(オルニチル)-ヒドロキシル アミン	2,000 ~ 3,000
対照 β-アミノプロピオニトリル	500 ~ 1,000

実施例 1 γ-グルタミルヒドラジンを有効成分とする軟膏剤

γ-グルタミルヒドラジン	3.0g
白色ワセリン	24.3g
セタノール	21.3g
プロピレングリコール	11.6g
ラウリル硫酸ナトリウム	1.5g
パラオキシ安息香酸メチル	0.03g
精製水	適量
	100g

白色ワセリンおよびセタノールを水浴上でとかし、攪拌し、温度を約75℃に保つ。γ-グルタミルヒドラジンを除く、その他の配合成分はあらかじめ、精製水に溶かして75℃に加温しておいて、その液を上記の白色ワセリンおよびセタノールに加える。温度が約50℃になつた時にγ-グルタミルヒドラジンを加え、固まるまで攪拌する。

上記に示した実験例に見られるように、前記のアミノ酸誘導体の中でも特にγ-グルタミルヒドラジンはコラーゲン繊維の架橋形成に関与しているLO酵素活性を特異的に抑制する作用を有し、毒性も明らかに少ないことからコラーゲンの異常増殖を伴う疾患たとえばアテローム硬化症、肝硬変症、肥厚性瘢痕、ケロイド、強皮症、リウマチ性関節炎、肺線維症、象皮症ならびにその他の膠原病の治療用剤として特に好ましく使用しうるものである。本発明の治療用剤の具体的な臨床使用においては経口、皮下注射、経皮あるいは直接塗布等の投与方法が用いられるが、特に直接塗布あるいは局所注射による方法は好ましい投与方法である。錠剤、酏剤、カプセル剤、坐剤、内服液剤または外用剤等の剤形で患者に投与される場合の用量は、通常、1日、10mg~5g、特に20mg~3gが好ましい用量である。

以下に本発明の治療用剤の製剤化の実施例を示すが、製剤はこれのみに限定されるものではない。

実施例 2 N-[3-(2-アミノエチルチオ)アラニル]-ヒドロキシルアミンを有効成分とする軟膏剤

N-[3-(2-アミノエチルチオ) アラニル]-ヒドロキシルアミン	3.0g
サラシミツロウ	7.8
セタノール	2.9
コレステロール	2.9
パラオキシ安息香酸メチル	0.03
白色ワセリン	適量

100.0g

セタノール、サラシミツロウ及び白色ワセリンを水浴上で加温してとかし、よく攪拌し、これにコレステロールを加えて完全にとけるまで攪拌する。加温をやめ、水浴を去り、約40℃になつた時N-[3-(2-アミノエチルチオ)アラニル]-ヒドロキシルアミン及びパラオキシ安息香酸メチルを加え、固まるまで攪拌する。

特開昭57-40409(7)

実施例 3 N-(オルニチル)-ヒドロキシル
アミンを有効成分とするカプセル剤
N-(オルニチル)-ヒドロキシルアミン 100
g、乳糖 94g、トウモロコシデンプン 60g、結晶
セルロース 40g 及びステアリン酸マグネシウム 6
g をよく混合する。これをカプセル充填機にて硬
カプセルに 300 個あて充填し、カプセル剤とする。

実施例 4 γ -グルタミルヒドラジン を有効成
分とする注射剤

γ -グルタミルヒドラジン 5g 及び塩化ナトリ
ウム 0.6g をとり、これを適量の注射用蒸留水に溶
解し、全量を 100cc とし、注射剤とする。

第 1 頁の続き

⑦発明者 朝比奈敏朗
茂原市東郷2142番地

特許出願人 三井東圧化学株式会社

代理人 弁理士 南 孝 夫



